

## PATENT ABSTRACTS OF JAPAN

(11)Publication number : 03-280895

(43)Date of publication of application : 11.12.1991

(51)Int.Cl.

C12P 41/00  
// C12P 13/04  
(C12P 41/00  
C12R 1:01 )  
(C12P 41/00  
C12R 1:38 )  
(C12P 41/00  
C12R 1:05 )  
(C12P 13/04  
C12R 1:01 )  
(C12P 13/04  
C12R 1:38 )  
(C12P 13/04  
C12R 1:05 )

(21)Application number : 02-080695

(71)Applicant : NITTO CHEM IND CO LTD

(22)Date of filing : 30.03.1990

(72)Inventor : ENDO RYUICHI  
YAMAGAMI TOMOHIDE

## (54) PRODUCTION OF D-ALPHA-PHENYLGLYCINE

(57)Abstract:

PURPOSE: To obtain the subject compound useful as a raw material for medicines and agricultural chemicals from raw materials available at a low cost according to chemical synthesis in a remarkably high yield by specifically hydrolyzing DL- $\alpha$ -phenylglycinonitrile in an aqueous medium using a specific microorganism.

CONSTITUTION: A microorganism [e.g. *Casheobacter* sp. BC4 (FERM P-11260)] having optically specific nitrile hydrolytic activity for DL- $\alpha$ -phenylglycinonitrile is used in an aqueous medium to convert the aforementioned nitrile into the objective compound. Furthermore, ammonia and cyanide ions are preferably present in the reaction system and the above-mentioned system is preferably regulated to pH7-11 from the viewpoint of improvement in yield.

## LEGAL STATUS

[Date of request for examination]

[Date of sending the examiner's decision of rejection]

[Kind of final disposal of application other than the examiner's decision of rejection or application converted registration]

[Date of final disposal for application]

[Patent number]

[Date of registration]

[Number of appeal against examiner's decision of rejection]

[Date of requesting appeal against examiner's decision of rejection]

[Date of extinction of right]

Copyright (C); 1998,2003 Japan Patent Office

⑬ 日本国特許庁(JP)

⑩ 特許出願公開

⑫ 公開特許公報(A)

平3-280895

⑭ Int. Cl.<sup>3</sup>  
C 12 P 41/00

識別記号 庁内整理番号  
A 7823-4B※

⑮ 公開 平成3年(1991)12月11日

審査請求 未請求 請求項の数 3 (全6頁)

⑯ 発明の名称 D- $\alpha$ -フェニルグリシンの製造法

⑰ 特 願 平2-80695

⑱ 出 願 平2(1990)3月30日

⑲ 発 明 者 遠 藤 隆 一 神奈川県横浜市鶴見区大黒町10番1号 日東化学工業株式会社中央研究所内

⑲ 発 明 者 山 上 知 秀 神奈川県横浜市鶴見区大黒町10番1号 日東化学工業株式会社中央研究所内

⑲ 出 願 人 日東化学工業株式会社 東京都千代田区丸の内1丁目5番1号  
最終頁に続く

明 細 書

1. 発明の名称

D- $\alpha$ -フェニルグリシンの製造法

2. 特許請求の範囲

1. DL- $\alpha$ -フェニルグリシノニトリルに対し光学特異的なニトリル加水分解活性を有する微生物の作用により、水性媒体中で該ニトリルをD- $\alpha$ -フェニルグリシンに変換せしめることを特徴とするD- $\alpha$ -フェニルグリシンの製造法。

2. 加水分解反応をアンモニアの存在下、中性ないし塩基性条件下で行うことを特徴とする請求項1記載の製造法。

3. 微生物がアシネトバクター(Acinetobacter)属、カセオバクター(Caseobacter)属、アルカリゲネス(Alcaligenes)属またはシュードモナス(Pseudomonas)属である請求項1記載の製造法。

3. 発明の詳細な説明

(産業上の利用分野)

本発明は、ラセミ体のフェニルグリシノニトリ

ルから微生物の作用によりD- $\alpha$ -フェニルグリシンを製造する方法に関するものである。

D- $\alpha$ -フェニルグリシンは、ペニシリン系抗生物質、或はセフェム系抗生物質など、医薬薬品原料として重要なものである。

(従来の技術と問題点)

D- $\alpha$ -フェニルグリシンの製造方法は、

- (1) DL-5-置換ヒダントインをD体特異的ジヒドロピリミジナーゼによりN-カルバミル-D- $\alpha$ -アミノ酸とし、次に脱カルバミル化する合成法〔S. Takahashi et al., J. Ferment. Technol., 56 492 (1978)、特開昭51-157713号公報参照〕、
  - (2) DL-5-置換ヒダントインをD-ヒダントイナーゼとN-カルバモイル-D- $\alpha$ -アミノ酸ヒドロラーゼを含む微生物により1段でD- $\alpha$ -アミノ酸に変換する方法〔特開昭54-89088号公報参照〕、
  - (3) DL- $\alpha$ -アミノ酸アミドをD体特異的アミダーゼにより加水分解しD- $\alpha$ -アミノ酸に変換する方法〔特公昭63-87998号公報参照〕などが公知である。
- しかし、DL- $\alpha$ -アミノ酸アミドの加水分解法では、

L体アミノ酸アミドが未反応分として残り、これを分離、回収後ラセミ化し再使用する工程がさらに必要となる。また、ヒダントイン誘導体を原料とする方法では、原料のラセミ化を伴う反応となり経済的であるが、脂肪族ヒダントインに対しては、一般的に芳香族ヒダントインと比べてラセミ化しにくいという欠点があり対象とするヒダントイン化合物が限定される。

一方、アミノニトリルから特異的に、アミノ酸を生産する方法としては、

- (1) プレバクテリウム属による相当するアミノニトリルからのL-メチオニン、L-アラニン、L-フェニルアラニンなどの生産 (J.C. Jallageas, et.al, *Advances in Biochemical Engineering* 14 1 参照)、
- (2) アシネトバクテリウム属によるDL- $\alpha$ -アミノプロピオニトリルからのL-アラニンの生産 (Anne M., et.al, *Biotechnology Letters* 7 865(1985) 参照)、
- (3) ノカルディア属、ミコバクテリウム属、コリ

分解反応とアンモニアの存在下で中性ないし塩基性の水性媒体中で起こるフェニルグリシノニトリルのラセミ化反応との共役的な反応により実質的にDL- $\alpha$ -フェニルグリシノニトリルの全てをD- $\alpha$ -フェニルグリシンに変換できることを見出した。本発明はこれらの知見に基づくものである。

すなわち、本発明は、DL- $\alpha$ -フェニルグリシノニトリルに対し光学特異的なニトリル加水分解活性を有する微生物の作用により、水性媒体中で該ニトリルをD- $\alpha$ -フェニルグリシンに変換せしめること、あるいはさらにこの加水分解反応をアンモニアの存在下、中性ないしは塩基性条件下で行うことを特徴とするD- $\alpha$ -フェニルグリシンの製造法である。

本発明によれば、基質アミノニトリルの化学的なラセミ化とD特異的なニトリル加水分解とにより、DL- $\alpha$ -フェニルグリシノニトリルから理論的に100%の収率で目的物を得ることができ経済的に有利である。

ネバクテリウム属による相当するDL-アミノニトリルからのL-バリン、L-ロイシンの生産方法 (特開平1-317393号公報参照) などがある。

しかし、これらの方法は、すべてアミノニトリルよりL-アミノ酸を製造する方法に関するものでありアミノニトリルから直接D-アミノ酸を生産するものではない。またDL- $\alpha$ -フェニルグリシノニトリルからD- $\alpha$ -フェニルグリシンを微生物作用により生産したという知見はない。

(発明が解決しようとする問題点)

本発明者らは、D- $\alpha$ -フェニルグリシンの工業的に有利な製造方法を開発すべく化学合成で安価に得られるDL- $\alpha$ -フェニルグリシノニトリルをD- $\alpha$ -フェニルグリシンに特異的に変換する新規な技術について鋭意研究を行った結果、DL- $\alpha$ -フェニルグリシノニトリルに対し光学特異的なニトリル加水分解活性を有する微生物の作用により、DL- $\alpha$ -フェニルグリシノニトリルをD- $\alpha$ -フェニルグリシンに特異的に変換し得ること、さらにこの微生物によるD特異的な加水

本発明において、使用される微生物は、アシネトバクテリウム属(Acinetobacter)属、カセオバクテリウム属(Caseobacter)属、アルカリゲネス属(Alcaligenes)属またはシュードモナス属(Pseudomonas)属に属する微生物、またはこれらより誘導された変異株であり、具体的には本発明者らが土壌中より新たに分離したカセオバクテリウム sp. BC4 (微工研菌寄第11260号)、カセオバクテリウム sp. BC23 (微工研菌寄第11261号)、シュードモナス sp. BC13-2 (微工研菌寄第11266号)、シュードモナス sp. BC15-2 (微工研菌寄第11267号)、アルカリゲネス sp. BC16-2 (微工研菌寄第11276号)、アシネトバクテリウム sp. BC9-2 (微工研菌寄第11262号)の菌株を挙げることができる。これらの微生物は、いずれも工業技術院微生物工業技術研究所(微工研)に上記番号にて寄託されており、それぞれの菌学的性質は以下に示すとおりである。

BC4 およびBC23菌株

	BC4	BC23
形 態	多形性桿菌	多形性桿菌
グラム染色性	+	+
芽 胞	-	-
運 動 性	-	-
オキシダーゼ	-	-
カタラーゼ	+	+
キノ ン 系	MX-8 (H <sub>2</sub> )	MX-8 (H <sub>2</sub> )
O F	NT	NT
3-オクトール-2 の産生	NT	NT
rod-coccus cycle	+	+
集落周辺細胞の伸長	認めず	認めず
産気下での生育	-	-
細胞壁の772/酸	meso 772/	meso 772/
グリコシル試験	ビメリン酸	ビメリン酸
細胞壁の糖組成	(772/型)	(772/型)
アラビノース	+	+
ガラクトース	+	+

NT: 試験せず(以下、同じ)

BC13-2およびBC15-2菌株

	BC13-2	BC15-2
形 態	桿 菌	桿 菌
グラム染色性	-	-
芽 胞	-	-
運 動 性	+	+
鞭 毛	極 毛	極 毛
オキシダーゼ	+	+
カタラーゼ	+	+
キノ ン 系	NT	NT
O F	○	○
3-オクトール-2 の産生	NT	NT

BC16-2およびBC9-2菌株

	BC16-2	BC9-2
形 態	桿 菌	桿 菌
グラム染色性	-	-
芽 胞	-	-
運 動 性	+	+
鞭 毛	周 毛	NT
オキシダーゼ	+	-

カタラーゼ	+	+
キノ ン 系	Q-8	NT
O F	アルカリ化	-
3-オクトール-2 の産生	-	NT

以上の菌学的性質をバージーズ マニュアル  
オブ システムチック バクテリオロジー (Ber-  
gey's Manual of Systematic Bacteriology)  
(1986)に従って分類すると BC4およびBC23株はカ  
セオバクター属、BC13-2およびBC15-2株はシュ  
ードモナス属、BC16-2株はアルカリゲネス属および  
BC9-2株はアシネトバクター属に属する細菌とそ  
れぞれ同定された。

次に本発明の実施態様について説明する。

本発明に使用される微生物の培養には、通常資  
化しうる炭素源、窒素源および微生物の生育に必  
要な無機栄養素を含有する培地が用いられる。  
例えば、炭素源としてはグルコース、グリセロー  
ル、シュクロース、蜂蜜等、窒素源としては酵  
母エキス、硫酸アンモニウム、塩化アンモニウム

等、無機栄養素としては硫酸ナトリウム、塩化マ  
グネシウム、塩化カルシウム、硫酸マンガン、塩  
化第2鉄、硫酸亜鉛等である。また、培養の初期  
または中期に生育を大きく阻害しない濃度のニト  
リル類(ケイ皮酸ニトリル、ベンジルシアニド、  
ベンゾニトリル、2-シアノピリジン、プロピオ  
ニトリル、イソブチロニトリル等)、アミド類  
(フェニルアセトアミド、4-ピリジンカルボン  
酸アミド、イソブチルアミド)、ラクタム類  
(ε-カプロラクタム、γ-ブチロラクタム等)  
を添加すると、より高い酵素活性が得られるので  
好ましい。

培養は、好氣的条件下でpH 4~10、温度20~50  
で、24~96時間で、それぞれの微生物に適した範  
囲に調整しつつ行えばよい。

加水分解反応は、上記により微生物を培養し、  
その培養液、培養液から分離した菌体、菌体処理  
物(菌体破砕物、抽出酵素)または常法により固  
定化した菌体あるいは酵素をDL-α-フェニル  
グリシノニトリルと混合すればよい。この際、反

応系にアンモニアを共存させ、且つ該系を中性ないし塩基性、pH値で7~11に調整することにより、DL- $\alpha$ -フェニルグリシノニトリルから理論的に100%の収率で目的物を得ることができる。さらにアンモニアに加えてシアニオンを存在させることによりより一層の収率向上が期待できる。

アンモニアの添加量は、原料ニトリル1モルに対しアンモニア1~500モル、好ましくは10~100モルで、アンモニア源としては、通常用いられるアンモニア水、アンモニウム塩であれば何れでもよく、アンモニア水-塩化アンモニウムをはじめとするアンモニア系緩衝液とすれば効果的である。また、シアニオン源としてはシアニ化カリウム、シアニ化ナトリウム等のシアニ化合物が使用できるが、その添加量は、原料ニトリル1モルに対し0.1~100モル、好ましくは1~50モルである。

反応液中のDL- $\alpha$ -フェニルグリシノニトリルは、通常0.01~5.0重量%、DL- $\alpha$ -フェニルグリシノニトリルに対する微生物の使用量は、乾燥固体量として0.01~5.0重量%、反応温度は

氷点~60℃、好ましくは、10~50℃で、0.5~72時間反応させればよい。

また、原料のDL- $\alpha$ -フェニルグリシノニトリル、アンモニアおよびシアニ化合物は、反応開始時に一括添加または反応開始後逐次あるいは連続添加する等の何れの方法を採用してもよい。

D- $\alpha$ -フェニルグリシンを含む反応液からのD- $\alpha$ -フェニルグリシンの単離は、遠心分離等により固体を除去後、濃縮、イオン交換、抽出、晶析など公知の方法を利用することにより目的物であるD- $\alpha$ -フェニルグリシンを取得することができる。

#### 〔発明の効果〕

本発明によれば、DL- $\alpha$ -フェニルグリシノニトリルをD特異的に加水分解することができ、さらにこの微生物によるD特異的な加水分解反応とアンモニアの存在下で中性付近ないし塩基性の水性媒体中で起こるフェニルグリシノニトリルのラセミ化反応との共役的な反応により実質的にDL- $\alpha$ -フェニルグリシノニトリルの全てをD-

$\alpha$ -フェニルグリシンに変換できる。

#### 〔実施例〕

以下、実施例により本発明を具体的に説明するがこれら実施例は本発明を限定するものではない。

#### 実施例1

##### (1) 培養

表1に示す各微生物を下記の培地に接種し培養した。

##### 培地組成

グリセロール	30 g / l
ベンジルシアニド	0.2 g / l
酵母エキス	3 g / l
K <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>	3 g / l
Na <sub>2</sub> SO <sub>4</sub>	0.3 g / l
HgCl <sub>2</sub>	0.2 g / l
CaCl <sub>2</sub>	40 mg / l
MnSO <sub>4</sub> · 4H <sub>2</sub> O	4 mg / l
FeCl <sub>3</sub> · 7H <sub>2</sub> O	0.7 mg / l
ZnSO <sub>4</sub>	0.1 mg / l
pH	7.2

##### 培養

上記培地 100mlを含む 500ml容三角フラスコで30℃、2日間振とう培養を行った。

##### (3) 加水分解反応

得られた培養液から固体を遠心分離にて回収し20mMりん酸緩衝液(pH 7.5)で洗浄し、沈澱した固体を同りん酸緩衝液10mlに再懸濁した。終濃度を10mM DL- $\alpha$ -フェニルグリシノニトリルとする50mMりん酸緩衝液(pH 7.5)に上記菌体懸濁液1mlを添加して全体で2mlとし15℃で9時間反応させた。反応終了後、反応液を遠心分離して固体を除去した後、上清液をダイセル化学工業社製 CHIRALPAK CR (4)を充填剤とするカラムを用いて高速液体クロマトグラフィーで分析し、反応液中のD- $\alpha$ -フェニルグリシン量を測定した。

結果を表1に示した。

##### 実施例2

実施例1と同様に各属の微生物を培養後、遠心分離にて集菌、洗浄し20mMりん酸緩衝液に懸濁した。次に、上記菌体1mlを含むDL- $\alpha$ -フェニ

ルグリシノニトリル10mM、アンモニア水 0.4M、  
シアン化カリウム0.2Mとする 2mlの反応液を調製  
した。この溶液を35℃で4時間反応させた。反応  
終了後、反応液を遠心分離して固体を除去し、上  
清液を実施例1と同様に高速液体クロマトグラフ  
ィーにて分析した。

結果を表2に示した。

表 1

菌 株	仕込 固体量 (OD 630nm)	D- $\alpha$ -フェニルグリシン	
		生成量 (mM)	光学純度 (%e.e)
カビオバクター sp. BC4	12.4	2.8	100
カビオバクター sp. BC23	17.6	3.4	100
アモリゲネス sp. BC16-2	18.8	3.2	54
シュ-ドモナス sp. BC13-2	33.9	4.9	100
シュ-ドモナス sp. BC15-2	20.1	4.8	95
アシネトバクター sp. BC9-2	17.8	4.7	70

表 2

菌 株	仕込 固体量 (OD 630nm)	D- $\alpha$ -フェニルグリシン	
		生成量 (mM)	光学純度 (%e.e)
カビオバクター sp. BC4	21.2	7.5	74
カビオバクター sp. BC23	23.6	8.2	76
アモリゲネス sp. BC16-2	25.9	6.1	80
シュ-ドモナス sp. BC13-2	30.2	7.2	79
シュ-ドモナス sp. BC15-2	22.9	6.8	73
アシネトバクター sp. BC9-2	20.5	7.0	81

特許出願人

日東化学工業株式会社

第1頁の続き

⑤Int. Cl. 3

識別記号

庁内整理番号

8931-4B

// C 12 P 13/04  
 (C 12 P 41/00  
 C 12 R 1:01)  
 (C 12 P 41/00  
 C 12 R 1:38)  
 (C 12 P 41/00  
 C 12 R 1:05)  
 (C 12 P 13/04  
 C 12 R 1:01)  
 (C 12 P 13/04  
 C 12 R 1:38)  
 (C 12 P 13/04  
 C 12 R 1:05)

【公報種別】特許法第17条の2の規定による補正の掲載

【部門区分】第1部門第1区分

【発行日】平成10年(1998)8月18日

【公開番号】特開平3-280895

【公開日】平成3年(1991)12月11日

【年通号数】公開特許公報3-2809

【出願番号】特願平2-80695

【国際特許分類第6版】

C12P 41/00

// C12P 13/04

(C12P 41/00

C12R 1:01 )

(C12P 41/00

C12R 1:38 )

(C12P 41/00

C12R 1:05 )

(C12P 13/04

C12R 1:01 )

(C12P 13/04

C12R 1:38 )

(C12P 13/04

C12R 1:05 )

【F I】

C12P 41/00 A

C12P 13/04



手続補正書

平成8年1月17日

特許庁長官 宛 井 寿 殿

1. 事件の表示

平成2年特許願第80696号

2. 発明の名称

D-α-フェニルグリシンの製造法

3. 補正をする者

事件との関係 特許出願人

〒100 東京都千代田区丸の内一丁目5番1号

(395) 日東化学工業株式会社

代表者 片岡 良

電話 東京3271-3081



4. 補正命令の日付 自発補正

5. 補正により増加する請求項の数 なし

6. 補正の対象

明細書の発明の詳細な説明の欄



7. 補正の内容

(1) 明細書第8頁第7～8行の「微工研国寄第11260号」を「微工研条寄第3316号」に訂正します。

(2) 明細書第8頁第9～10行の「微工研国寄第11266号」を「微工研条寄第3319号」に訂正します。

(3) 明細書第8頁第11行の「微工研国寄第11267号」を「微工研条寄第3320号」に訂正します。

(4) 明細書第8頁第12行の「微工研国寄第11276号」を「微工研条寄第3321号」に訂正します。

(5) 明細書第8頁第13行の「微工研国寄第11262号」を「微工研条寄第3317号」に訂正します。

以上